

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001088

International filing date: 27 January 2005 (27.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-019118
Filing date: 28 January 2004 (28.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

28. 1. 2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2004年 1月28日
Date of Application:

出願番号 特願2004-019118
Application Number:

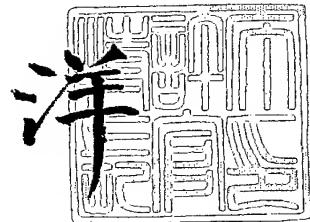
[ST. 10/C] : [JP2004-019118]

出願人 株式会社林原生物化学研究所
Applicant(s):

2005年 3月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3019983

【書類名】 特許願
【整理番号】 10104401
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 C12P 19/44
C12N 9/10
C07H 3/06

【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

【氏名】 西本 友之

【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

【氏名】 久保田 優夫

【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

【氏名】 福田 惠温

【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

【氏名】 三宅 俊雄

【特許出願人】
【識別番号】 000155908
【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所
【代表者】 林原 健

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 035736
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

構成糖としてグルコースを含む糖化合物と、イノシトール、リビトール、エリスリトル及びグリセロールから選ばれる1種又は2種以上のポリアルコールとにトレハロースホスホリラーゼを作用させることを特徴とするポリアルコールへのグルコシル基の転移方法。

【請求項 2】

構成糖としてグルコースを含む糖化合物と、グルクロン酸及び／又はその塩とにトレハロースホスホリラーゼを作用させることを特徴とするグルクロン酸及び／又はその塩へのグルコシル基の転移方法。

【請求項 3】

構成糖としてグルコースを含む糖化合物と、イソマルトース、ゲンチビオース、メリビオース、イソマルトリオース及びイソパノースから選ばれる1種又は2種以上のグルコース6位糖質誘導体とにトレハロースホスホリラーゼを作用させることを特徴とするグルコース6位糖質誘導体へのグルコシル基の転移方法。

【請求項 4】

構成糖としてグルコースを含む糖化合物が、 β -D-グルコース-1-リン酸及び／又はその塩であるか、又はトレハロースである請求項1乃至3のいずれかに記載のグルコシル基の転移方法。

【請求項 5】

トレハロースホスホリラーゼが、pH 7.0、60℃の条件下で1時間保持したときトレハロースを加リン酸分解する活性を80%以上保持する温度安定性を有するものである請求項1乃至4のいずれかに記載のグルコシル基の転移方法。

【請求項 6】

トレハロースホスホリラーゼが、サーモアナエロビウム・プロッキイ起源の天然型もしくは組換え型酵素である請求項1乃至5のいずれかに記載のグルコシル基の転移方法。

【請求項 7】

請求項1、4乃至6のいずれかに記載のポリアルコールへのグルコシル基の転移方法によりグルコシル転移ポリアルコールを生成させる工程と、生成したグルコシル転移ポリアルコール及び／又はグルコシル転移ポリアルコール含有物を採取する工程とを含むグルコシル転移ポリアルコール及び／又はグルコシル転移ポリアルコール含有物の製造方法。

【請求項 8】

生成したグルコシル転移ポリアルコール及び／又はグルコシル転移ポリアルコール含有物を、脱色、脱塩、濾過、濃縮、クロマトグラフィー、乾燥及び結晶化から選ばれる1種又は2種以上を含む工程を経て採取する請求項7記載のグルコシル転移ポリアルコール及び／又はグルコシル転移ポリアルコール含有物の製造方法。

【請求項 9】

請求項2、4乃至6のいずれかに記載のグルクロン酸及び／又はその塩へのグルコシル基の転移方法によりグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩を生成させる工程と、生成したグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩、及び／又はグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩含有物を採取する工程とを含むグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩、及び／又はグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩含有物の製造方法。

【請求項 10】

生成したグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩、及び／又はグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩含有物を、脱色、脱塩、濾過、吸着、イオン透析、濃縮、クロマトグラフィー、乾燥及び結晶化から選ばれる1種又は2種以上を含む工程を経て採取する請求項9記載のグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩、及び／又はグルコシル転移グルクロン酸及び／又はその塩含有物の製造方法。

【請求項 11】

請求項 3 乃至 6 のいずれかに記載のグルコース 6 位糖質誘導体へのグルコシル基の転移方法によりグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体を生成させる工程と、生成したグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体及び／又はグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体含有物を採取する工程とを含むグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体及び／又はグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体含有物の製造方法。

【請求項 12】

生成したグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体及び／又はグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体含有物を、脱色、脱塩、濾過、吸着、イオン透析、濃縮、クロマトグラフィー、乾燥及び結晶化から選ばれる 1 種又は 2 種以上を含む工程を経て採取する請求項 11 記載のグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体及び／又はグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体含有物の製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】グルコシル基の転移方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリアルコール、グルクロン酸及び／又はその塩（以下、本明細書では「グルクロン酸及び／又はその塩」を単に「グルクロン酸」と略称する。）、及びグルコース6位糖質誘導体にグルコシル基を転移する新規な方法、より詳細には、トレハロースホスホリラーゼの作用を利用してポarialコール、グルクロン酸、及びグルコース6位糖質誘導体にグルコシル基を転移する新規な方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、オリゴ糖をはじめとする諸種の糖質が有する機能が続々と明らかになりつつある。これに伴って、機能性糖質に対する要望は多様化し、より優れた機能を有する糖質や、全く新規な機能を有する糖質、例えば、食品・化粧品・医薬品以外の分野でも利用できる有用な機能を有する糖質などの実用化を望む声が高まっている。斯界においては、斯かる要望に応えるべく、新規な又は希少な各種糖質の工業的製造を目的とした新規な方法の確立を目指した研究と、その新規な方法で製造された糖質の機能を解析する研究が精力的に進められている。

【0003】

糖質の一種であるポarialコール（一般に、「糖アルコール」もしくは「多価アルコール」とも呼ばれている。）、グルクロン酸、及びグルコース6位糖質誘導体は、低う食性、難消化性、ミネラルとの塩形成など食品素材として優れた機能を有することから、それらの関連化合物、例えば、グルコシル転移ポarialコール、グルコシル転移グルクロン酸、グルコシル転移グルコース6位糖質誘導体などを製造し、それらの機能の解析を進めることにより、より優れた機能や新規な機能を有する糖質が実用化できる可能性がある。

【0004】

グルコシル転移ポarialコールの製造方法に関しては、例えば、スクロースホスホリラーゼ、コーディビオースホスホリラーゼ及び α -グルコシダーゼによるグルコシル基の転移作用を利用した方法が特許文献1乃至3に、また、糖転移グルクロン酸の製造方法に関しては、例えば、 β -ガラクトシダーゼによる乳糖からのガラクトシル基の転移反応を利用した方法が特許文献4に開示されている。さらに、グルコシル転移グルコース6位糖質誘導体の製造方法に関しては、例えば、スクロースホスホリラーゼ、コーディビオースホスホリラーゼ、 α -グルコシダーゼ、デキストラントスクラーゼ、シクロマルトデキストリングルカノトランスクレラーゼなどによるグルコシル基の転移作用を利用した製造方法が様々提案されている。これらの方による製造物は、用いられる酵素の基質特異性の違いから、糖組成や含まれる個々の糖質の構造などの点でそれぞれに特徴を有し、したがって、これらの製造物が發揮する機能も当然異なるものと考えられる。しかしながら、本発明者等は、糖質に対する要望が多様化している現状を考慮すると、今までに提案されているグルコシル転移ポarialコール、糖転移酸性糖、グルコシル転移オリゴ糖の製造方法の種類は、その要望に応えるのになお不十分であり、さらに多様な製造方法の提供が必要であるという結論に達した。そして、従来の、グルコシル転移ポarialコール、糖転移酸性糖、グルコシル転移グルコース6位糖質誘導体の製造方法の場合とは全く異なる酵素を用いてグルコシル転移ポarialコール、グルコシル転移グルクロン酸、及びグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体を生成する方法が提供されれば、より優れた機能や新規な機能を有する糖質の多様な製造方法の確立に大きく貢献できると考えた。

【0005】

【特許文献1】特開平5-91891号公報

【特許文献2】特開2002-65293号公報

【特許文献3】特開平2-163092号公報

【特許文献4】特開平6-253879号公報

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

斯かる状況に鑑み、本発明の課題は、酵素を利用してグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、及びグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体を生成する新規な方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

上記の課題を解決するために、本発明者等は、まず、ポリアルコールへの糖転移活性を有することが想定される公知の糖関連酵素を対象として、代表的なポリアルコールのひとつであるソルビトールにグルコシル基を転移する作用の有無を検討した。しかしながら、ここで検討した範囲では、上記の課題を解決する新規な方法を確立し得る酵素を見出すには至らなかった。そこで本発明者等は次に、ポリアルコールへの糖転移活性を有することが想定されるか否かに閑わらずにさらに幅広い酵素群を対象として、ソルビトール以外の諸種のポリアルコールにグルコシル基を転移する作用の有無を検討した。その結果、同じ特許出願人による特開平10-304881号公報においてトレハロースホスホリラーゼがソルビトールにグルコシル基を転移しなかったことが記載されており、この事実から一般的に該酵素はポリアルコールにグルコシル基を転移する作用を有しないと考えられてきたところ、全く意外なことに、該酵素は、イノシトールをはじめとするポリアルコールには顕著にグルコシル基を転移する作用を有することが判明した。

【0008】

さらに、グルコースの6位が酸化した酸性糖であるグルクロン酸や、グルコースの6位にグルコシル基や他の糖残基が結合したオリゴ糖（グルコース6位糖質誘導体）へのグルコシル基の転移を検討した結果、トレハロースホスホリラーゼがグルクロン酸やイソマルトースをはじめとするグルコース6位糖質誘導体にも顕著にグルコシル基を転移する作用を有することが判明した。そして、反応規模を拡大してトレハロースホスホリラーゼの反応によるポリアルコール、グルクロン酸、及びグルコース6位糖質誘導体へのグルコシル基の転移反応を行ったところ、これら反応が、グルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸及びグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体の工業的規模での製造に有利に利用できることが確認された。本発明は、以上の本発明者等による独自の研究成果に基づいて為されたものである。

【0009】

すなわち、本発明は、構成糖としてグルコースを含む糖化合物と、イノシトール、リビトール、エリスリトール及びグリセロールから選ばれる1種又は2種以上のポリアルコール、グルクロン酸、及び／又はイソマルトース、ゲンチビオース、メリビオース、イソマルトオリオース及びイソパノースから選ばれる1種又は2種以上のグルコース6位糖質誘導体とにトレハロースホスホリラーゼを作用させることを特徴とするポリアルコール、グルクロン酸、及びグルコース6位糖質誘導体へのグルコシル基の転移方法を提供することにより上記課題を解決するものである。

【発明の効果】**【0010】**

本発明の転移方法は、従来のグルコシル転移方法に比べ、高効率で副生成物が少ないという特徴を有しており、本方法によれば、従来知られていなかった又は稀少とされてきたグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸及びグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体を工業的規模で製造することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】**【0011】**

本発明のポリアルコール、グルクロン酸及びグルコース6位糖質誘導体へのグルコシル基の転移方法（以下、単に「本発明の転移方法」又は「当該転移方法」という場合がある。）はトレハロースホスホリラーゼを利用する特徴とする。本発明でいうトレハロ

ースとは、 α -D-グルコシル α -D-グルコシドで表される二糖を意味する。本発明でいうトレハロースホスホリラーゼとは、この二糖トレハロースを、無機リン酸及び／又はその塩の存在下で加リン酸分解してD-グルコース及び β -D-グルコース-1リン酸及び／又はその塩（以下、本明細書では、不都合が生じない限り、「 β -D-グルコース-1リン酸及び／又はその塩」を単に「 β -D-グルコース-1リン酸」と略称する。）を生成する反応ならびにこの逆反応を触媒する酵素を意味する。本発明で利用できるトレハロースホスホリラーゼは、このように定義され、下記に詳述する本発明で用いるポリアルコールの1種又は2種以上、グルクロン酸、及び／又は、グルコース6位糖質誘導体の1種又は2種以上にグルコシル基を転移する作用を有するものである限り起源や調製方法などは特定のものに限定されない。例えば、同じ特許出願人による特開平10-304881号公報に開示された、サーモアナエロビウム・ブロッキイ（ATCC 35047）起源の天然型ならびに組換え型の該酵素はいずれも本発明に有利に利用できる。また、同公報に開示された同酵素をコードするDNAに蛋白質工学的手法を適用して得られる変異酵素も、所期の転移作用を実質的に消失していないものである限り本発明に利用できる。さらには、所期の転移作用を有している限り、他の微生物由来のトレハロースホスホリラーゼ、例えば、特開平8-131157号公報に開示されているプレシオモナス（Plesiomonas）属微生物起源のトレハロースホスホリラーゼなどを用いることも有利に実施できる。

【0012】

本発明でいうポリアルコールとは、分子中に2個以上の水酸基を有するアルコール、通常、多価アルコール又は糖アルコールとも呼ばれる化合物を意味する。本発明でグルコシル基の受容体となるポリアルコールは、イノシトール、リビトール、エリスリトール及びグリセロールから選ばれる1種又は2種以上であり、その調製方法やその存在形態には特に制限はない。例えば、市販品を含む、天然より単離された調製品、酵素的又は化学的に調製ないしは合成された調製品、さらには、本発明の転移方法における酵素反応の進行や当該転移方法による生成物の利用に悪影響を及ぼさない範囲で、該ポリアルコール以外の夾雜物質を含んでいる調製品や、以上のような調製品を組み合わせてなる組成物であってもよい。なお、イノシトールには、ミオイノシトール、D-イノシトール、L-イノシトール等の立体異性体が存在する。これらイノシトール異性体はいずれも本発明に有利に利用できるけれども、これらのうちでミオイノシトールはグルコシル転移生成物の生成割合が比較的高いのでこの発明に特に有用である。

【0013】

本発明でいうグルクロン酸とは、グルコースの6位がカルボキシル基に酸化された構造を有する酸性糖を意味し、その調製方法やその存在形態には特に制限はない。例えば、市販品を含む、天然より単離された調製品、酵素的又は化学的に調製ないしは合成された調製品、さらには、本発明の転移方法における酵素反応の進行や当該転移方法による生成物の利用に悪影響を及ぼさない範囲で、該グルクロン酸以外の夾雜物質を含んでいる調製品や、以上のような調製品を組み合わせてなる組成物であってもよい。

【0014】

本発明でいうグルコース6位糖質誘導体とは、グルコース分子の6位が他の糖質と結合した誘導体を意味する。本発明でグルコシル基の受容体となるグルコース6位糖質誘導体は、イソマルトース、ゲンチビオース、メリビオース、イソマルトオリオース及びイソパノースから選ばれる1種又は2種以上であり、その調製方法やその存在形態には特に制限はない。例えば、市販品を含む、天然より単離された調製品、酵素的又は化学的に調製ないしは合成された調製品、さらには、本発明の転移方法における酵素反応の進行や当該転移方法による生成物の利用に悪影響を及ぼさない範囲で、該グルコース6位糖質誘導体以外の夾雜物質を含んでいる調製品や、以上のような調製品を組み合わせてなる組成物であってもよい。

【0015】

本発明の転移方法で用いる、構成糖としてグルコースを含む糖化合物とは、トレハロー

スホスホリラーゼの作用によるグルコシル転移反応においてグルコシル基供与体となる、構成糖としてグルコースを含有するグルコースの誘導体、オリゴ糖ならびにその誘導体を意味する。斯かる糖化合物の調製方法や存在形態に特に制限はなく、例えば、市販品を含む、天然より単離された調製品、酵素的又は化学的に調製ないしは合成された調製品、さらには、本発明の転移方法における酵素反応の進行や当該転移方法による生成物の利用に悪影響を及ぼさない範囲で、斯かる糖化合物以外の夾雑物質を含んでいる調製品や、以上のような調製品を組み合わせてなる組成物であってもよい。斯かる糖化合物として比較的望ましいものは β -D-グルコース-1リン酸である。 β -D-グルコース-1リン酸を酵素的に調製するには、例えば、トレハロースにトレハロースホスホリラーゼを作用させたり、マルトースにマルトースホスホリラーゼ（オリエンタル酵母株式会社販売等）を作りさせたり、グルコースが α -1, 2結合で連結してなるコージビオースやコージトリオースなどのコージオリゴ糖にコージビオースホスホリラーゼ（同じ特許出願人による特開平10-304882号に記載のもの等）を作用させることなどにより β -D-グルコース-1リン酸を生成させ、これを、必要に応じて常法により所望のレベルにまで精製すればよい。また、本発明においては、酵素の作用を受けて β -D-グルコース-1リン酸を生成しうる、構成糖としてグルコース含む以上のようなオリゴ糖類をそのまま利用することもできる。例えば、トレハロースを利用する場合、トレハロースホスホリラーゼの作用による β -D-グルコース-1リン酸の生成と、生成した β -D-グルコース-1リン酸からのポリアルコール、グルクロン酸、及び／又はグルコース6位糖質誘導体へのグルコシル基の転移反応とが同時に進行することとなる。また、マルトース及び／又はコージオリゴ糖を利用する場合には、それから β -D-グルコース-1リン酸を生成する上述のマルトースホスホリラーゼ及び／又はコージビオースホスホリラーゼを本発明の転移方法を行う反応系に共存させれば、所期の転移反応を進行させることができる。

【0016】

上述のような、トレハロースホスホリラーゼとともに、ポリアルコール、グルクロン酸、及び／又はグルコース6位糖質誘導体、及び構成糖としてグルコースを含む糖化合物（以下、ポリアルコール、グルクロン酸、グルコース6位糖質誘導体及び構成糖としてグルコースを含む糖化合物のいずれか又は二者又はすべてを指して「基質」という場合がある。）を、通常は水溶液中で混合し、用いるトレハロースホスホリラーゼの酵素学的性質に応じて適宜選ばれる条件下で保持すれば、トレハロースホスホリラーゼの作用によりポリアルコール、グルクロン酸及び／又はグルコース6位糖質誘導体にグルコシル基を転移させることができる。同じ特許出願人による特開平10-304881号公報に開示されたトレハロースホスホリラーゼを利用する場合、該酵素が完全には失活しない条件、すなわち、温度は、通常、70℃以下、望ましくは、65℃以下が好適であり、pHは、通常、pH4.0乃至9.0、望ましくは、pH5.0乃至7.5が好適である。反応混合物中の基質の濃度は所期の反応が進行する限り特に制限はなく、例えば、ポリアルコールと構成糖としてグルコースを含む糖化合物とを、それぞれ、通常、0.1乃至40質量%、望ましくは、0.2乃至20質量%の範囲とし、両者の比を、通常、1:0.1乃至400、望ましくは、1:1乃至100、さらに望ましくは、1:2乃至50の範囲とするのが好適である。なお、構成糖としてグルコースを含む糖化合物として、トレハロース、マルトース及び／又はコージビオースを用い、必要に応じて、マルトースホスホリラーゼ及び／又はコージビオースホスホリラーゼを併用する場合には、適宜の濃度の無機リン酸及び／又はその塩、例えば、リン酸二水素ナトリウムなどを適宜の濃度、通常、0.5乃至100mM、望ましくは、1乃至50mMの範囲で共存させるのが好適である。また、マルトースホスホリラーゼ及び／又はコージビオースホスホリラーゼを併用する場合には、併用する酵素の酵素学的性質を考慮して、使用する全ての酵素がいずれも完全には失活しない条件を選定するのが望ましい。トレハロースホスホリラーゼの使用量に関しては、反応混合物中の基質の乾燥重量換算での総量1gに対し、通常、0.1乃至500単位、望ましくは、0.5乃至200単位とするのが好適である。なお、ここでいうトレハロースホスホリラーゼ活性の1単位とは、同じ特許出願人による特開平10-304881号公報

に記載の方法にしたがって、pH 5.5、60℃でトレハロースを基質として反応させたとき、1分間当たり $1 \mu\text{mol}$ のD-グルコースを生成する酵素量を意味する。以上のような反応混合物を用いて反応させる時間は、反応の進行の度合いに応じて適宜選択することができ、通常、2乃至200時間、望ましくは、4乃至100時間が好適である。

【0017】

一般に、酵素的に糖質を製造する場合には、その反応温度は可能な限り高く設定することが望ましい。これにより、反応中の雑菌汚染を防いだり、反応速度を高めたり、基質濃度を高めることができ、その結果、目的とする反応をより効率的に進行させることができることなどがその理由である。本発明の転移反応を実施する場合にも同様であり、反応温度は、通常、常温以上、望ましくは、40℃以上、より望ましくは、50℃以上とするのが好適である。したがって、本発明の転移方法の実施においては、このような好適な温度条件下で利用できる温度安定性、例えば、至適pHの条件下で60℃で1時間保持したときに本来の活性を、通常、80%以上、望ましくは、85%以上、より望ましくは、90%以上保持する温度安定性を有するトレハロースホスホリラーゼを利用することが望ましい。同じ特許出願人による特開平10-304881号公報に開示されたトレハロースホスホリラーゼはこのような望ましい温度安定性を有するので、本発明の実施にとりわけ有用である。

【0018】

以上のような本発明の転移方法を実施すると、反応混合物中にグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸及び/又はグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体が生成する。この発明でいうグルコシル転移ポリアルコールとはポリアルコールとグルコシル基が共有結合した糖化合物全般を意味する。また、この発明でいうグルコシル転移グルクロン酸とはグルクロン酸とグルコシル基が共有結合した糖化合物を意味する。さらに、この発明でいうグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体とはグルコース6位糖質誘導体とグルコシル基が共有結合した糖化合物全般を意味する。本発明の転移方法により生成するグルコシル転移ポリアルコールは、構成単位として、ポリアルコールとともに1個のグルコシル基を含む。また、本発明の転移方法により生成するグルコシル転移グルクロン酸は、構成単位として、グルクロン酸とともに1個のグルコシル基を含む。本発明の転移方法により生成するグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体は、グルコース6位糖質誘導体の分子中にグルコシル基が存在しない場合、1個のグルコシル基を含み、該分子中に1個又は2個以上のグルコシル基が存在する場合、そのグルコース6位糖質誘導体のグルコース基以外に1個のグルコシル基を含む。また、本発明の転移方法により生成するグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、又はグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体における構成単位どうしの結合様式には、トレハロースホスホリラーゼ以外の酵素を用いる転移方法の場合には通常見出されない、本発明に特徴的な結合様式が含まれる場合がある。例えば、当該転移反応で用いるポリアルコールが炭素数6の環状ポリアルコールのイノシトールである場合、生成するグルコシル転移ポリアルコールは、構成単位どうしの結合様式として $\alpha-1, 1'$ グルコシド結合を含む場合がある。

【0019】

以上のような本発明の転移方法で生成するグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、及び/又はグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体は、目的に応じて、反応混合物そのままの状態で、あるいは、慣用の方法により所望のレベルにまで精製した状態で諸種の用途に利用することができる。したがって、本発明の転移方法は、グルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、グルコシル転移グルコース6位糖質誘導体、及び/又はこれらグルコシル転移生成物含有物の製造方法における一工程として有利に実施できる。本発明は斯かるグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、グルコシル転移グルコース6位糖質誘導体、及び/又はこれらグルコシル転移生成物含有物の製造方法を提供するものもあり、当該製造方法は、本発明の転移方法を実施する工程と、この工程で生成したグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、グルコシル転移グルコース6位糖質誘導体、及び/又はこれらグルコ

シル転移生成物含有物を採取する工程を含んでなる。生成したグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、グルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体、及び／又はこれらグルコシル転移生成物含有物は、目的に応じて、慣用の方法、例えば、活性炭処理等による脱色、イオン交換樹脂処理等による脱塩、けい藻土等の助剤を用いる濾過、イオン交換樹脂等を用いるクロマトグラフィー、エバポレーター等を用いる濃縮、噴霧乾燥、真空乾燥、凍結乾燥などの乾燥、水・アルコール等の適宜の溶媒中で行う結晶化などから選ばれる適宜の工程を経て採取することができる。以上のような本発明の製造方法により製造される製品は、目的に応じて、グルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、又はグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体を結晶等の純粋な状態から他の成分を含む組成物に至るまでの諸種の純度で含む、粉末状、結晶粉末状、顆粒状、ブロック状、シラップ状など適宜の形状で提供される。本発明の製造方法により製造される製品は、本発明で用いられるポリアルコール、グルクロン酸、又はグルコース 6 位糖質誘導体と同様に、例えば、甘味料、難消化性甘味料、低う食性甘味料、保湿剤、澱粉老化防止剤、整腸剤、ミネラル吸収促進剤などとして健康食品・飲料を含む飲食品分野、化粧品分野、医薬品分野、飼料分野などの諸種の分野で有利に利用することができる。また、本発明の方法で製造される製品は、その機能性を解析するための研究用試薬として利用することもでき、斯かる解析の結果に基づいて、本発明の製造方法によるグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、グルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体、及び／又はこれらグルコシル転移生成物含有物は、例えば、防腐剤、保存剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、生体機能調節剤などの各種機能剤の一成分として上記のような諸種の分野で利用できる。

【0020】

以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明する。

【実施例 1】

【0021】

<ポリアルコールへのグルコシル基の転移>

【0022】

<実施例 1-1：トレハロースホスホリラーゼの調製>

同じ特許出願人による特開平 10-304881 号公報に記載された方法にしたがって、サーモアナエロビウム・プロッキイ (ATCC 35047) を、トレハロースを炭素源として含む培地内で 401 の培養規模で培養した。引き続き上記公報に記載の方法にしたがって、培養物より採取した菌体を超音波破碎し、その破碎物上清を採取した。上記公報に記載のトレハロースホスホリラーゼ活性の測定法に供して、この菌体破碎物上清がトレハロースホスホリラーゼ活性を示すことを確認した。

【0023】

上記の菌体破碎物上清を UF 膜濃縮し、1mL 当り約 30 単位のトレハロースホスホリラーゼ活性を有する酵素液 360mL を得た。このうち 300mL を、引き続き上記公報に記載の方法にしたがって、『D E A E - T Y P A R L G E L』(東ソー株式会社製) を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー、『ブチルトヨパール 650 ゲル』(東ソー株式会社製) を用いた疎水カラムクロマトグラフィー、及び『ウルトロゲル A c A 44』(セプラコル社製) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供し、7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動において单一のバンドを示すトレハロースホスホリラーゼの精製標品を得た。得られた精製標品の比活性は蛋白質 mg 当り約 78 単位であった。

【0024】

<実施例 1-2：トレハロースホスホリラーゼの作用によるポリアルコールへのグルコシル基の転移>

下記表 1 に示すポリアルコール (いずれも試薬級) のいずれかを濃度 1% (w/v) で、試薬級 β -D-グルコース-1リン酸を濃度 1.4% (w/v) で、実施例 1-1 で得たトレハロースホスホリラーゼを 1mL 当り 1 単位で、及び、酢酸緩衝液 (pH 6.0) を濃度 50 mM で含む水溶液を調製し、これを 50°C で 24 時間保持して反応させた。反

応後、各溶液より一部を採取し、これを乾固した後、ピリジンに溶解して、ガスクロマトグラフィー（以下、「GC」と略記する。）により分析した。GCにおいて、分析カラムは『2%シリコンOV-17／クロモゾルブW』（ジー・エル・サイエンス株式会社製）を充填したステンレスカラム（内径3mm×長さ2m）を用いた。キャリアーガスとして窒素ガスを用い、流量は40ml/分とした。分析カラムの温度は、試料注入後カラムオーブンを160℃から320℃まで毎分7.5℃の速度で昇温するべく制御した。検出には水素炎イオン化検出器を用いた。また、トレハロースホスホリラーゼを含まないこと以外は上記の反応溶液と同じ組成の溶液を調製し、上記と同じ条件で保持した後に、それぞれ同条件でのGCにより分析して、未反応のポリアルコール、ならびにβ-D-グルコース-1リン酸のクロマトグラムのパターンを確認した。反応溶液の分析により得たクロマトグラムにおける新たなピークの有無によりポリアルコールへのグルコシル基の転移が起きたか否かを判定した。また、グルコシル転移ポリアルコールの生成量は、本GC分析条件下におけるグルコシル転移ポリアルコールのピーク面積が、未反応のポリアルコールを含む全てのピークの面積の合計値に占める割合に基づいて評価し、60%以上のものを「+++」と、30%以上60%未満のものを「++」と、そして0%を越え30%未満のものを「+」として三段階で表した。それらの結果を、グルコシル転移ポリアルコールのGCにおける保持時間とともに表1に示す。

【0025】

【表1】

ポリアルコール	グルコシル基の転移	転移物の保持時間(分)
ソルビトール	-*	検出されず
ミオイノシトール	++	15.4及び16.6
エリスリトール	+	11.5
リビトール	+	13.6
グリセロール	+	9.6

*：グルコシル基の転移が起こらなかつたことを意味する。

【0026】

表1に示すとおり、また、同じ特許出願人による特開平10-304881号公報に記載されているとおり、ソルビトールに実施例1-1で調製したサモアナエロビウム・ブロッキイ起源のトレハロースホスホリラーゼを作用させた場合にはグルコシル基の転移は認められなかつた。これとは対照的に、他のポリアルコールであるミオイノシトール、エリスリトール、リビトール及びグリセロールに対しては、上記トレハロースホスホリラーゼの作用によつていずれもグルコシル基が転移したことが確認された。これらのポリアルコールのうち、ミオイノシトールに対しては「++」と、グルコシル基の転移が特に顕著であった。さらに、ミオイノシトールに対するグルコシル基の転移物としては、GCにおいて2つのピーク(GCの保持時間として15.4分及び16.6分)が認められたことから、2種類のグルコシル転移ミオイノシトールが生成することがわかつた。

【0027】

それぞれの反応液より、グルコシル転移ポリアルコールを、イオン交換樹脂を用いる調製用の高速液体クロマトグラフィーを含む糖質精製のための慣用の方法により、GC分析において他の夾雑物のピークが観察されない、実質的に单一のピークとして確認されるレベルにまで精製した。これらの精製標品を、ドウドロフ、『ザ・エンザイムズ(The Enzymes)』、第5巻、アカデミック・プレス社(1961年)、229乃至236頁に記載の方法に準じて、亜硫酸存在下でトレハロースホスホリラーゼを作用させ分解し、その分解物を上記のGCにしたがつて分析したところ、いずれのクロマトグラムにおいても、ポリアルコールとD-グルコースに相当するピークが、モル比に換算してほぼ1:1に相当する面積比で確認された。この結果は、ここで得た精製標品が、いずれも、ポリアルコールとグルコシル基が1:1のモル比で結合したグルコシル転移ポリアルコール

であることを意味している。なお、ミオイノシトールから生成した2種類のグルコシル転移ポリアルコールとも、ミオイノシトールとグルコシル基が1:1のモル比で結合したグルコシル転移ポリアルコールであることから、ミオイノシトールへのグルコシル基の転移反応においては、互いに結合様式の異なる2種類のグルコシル転移ポリアルコールが生成していることを示している。

【0028】

＜実施例1-3：トレハロースホスホリラーゼの作用によるグルクロン酸及びグルコース6位糖質誘導体へのグルコシル基の転移＞

下記表2に示すグルクロン酸及びグルコース6位糖質誘導体（いずれも試薬級）のいずれかを濃度1%（w/v）で、試薬級 β -D-グルコース-1リン酸を濃度1.4%（w/v）で、実施例1-1で得たトレハロースホスホリラーゼを1ml当たり1単位で、及び、酢酸緩衝液（pH 6.0）を濃度50mMで含む水溶液を調製し、これを50℃で24時間保持して反応させた。反応後、実験例1-2に記載の方法でGC分析し、実験例1-2と同様に、グルコシル転移生成物の生成量を、そのGC分析におけるグルコシル転移生成物のピーク面積が、未反応のグルクロン酸若しくはグルコース6位糖質誘導体のピークを含む全てのピークの面積の合計値に占める割合に基づいて評価し、60%以上のものを「+++」と、30%以上60%未満のものを「++」と、そして0%を越え30%未満のものを「+」として三段階で表した。その結果を表2に示す。

【0029】

【表2】

グルクロン酸 又は グルコース6位糖質誘導体	グルコシル基の転移	転移物の保持時間（分）
グルクロン酸	+	15.6
イソマルトース	+++	22.1
ゲンチオビオース	+++	22.1
メリビオース	+++	21.9
イソマルトトリオース	+++	31.6
イソパノース	+++	29.7

【0030】

表2に示すとおり、グルクロン酸と、グルコース6位糖質誘導体であるイソマルトース、ゲンチオビオース、メリビオース、イソマルトトリオース及びイソパノースのいずれに対しても、トレハロースホスホリラーゼの作用によってグルコシル基が転移したことが確認された。とりわけ、イソマルトース、ゲンチオビオース、メリビオース、イソマルトトリオース及びイソパノース、即ち、還元末端側にグルコース残基を有し、且つ、そのグルコース残基の6位に糖質が結合したグルコース6位糖質誘導体に対しては「+++」と評価され、グルクロン酸の場合の「+」に比べてグルコシル基の転移が顕著であった。加えて、トレハロースホスホリラーゼの作用により生成するグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体は、上記いずれのグルコース6位糖質誘導体の場合でも実質的に1種類であり、本グルコシル転移方法によれば、副生成物をほとんど生成しないという利点があることも判明した。

【0031】

それぞれの反応液より、グルコシル転移グルクロン酸若しくはグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体を、オクタデシルシリカゲルを用いる調製用の高速液体クロマトグラフィーを含む糖質精製のための慣用の方法により、上記のGCにおいて実質的に单一のピークとして確認されるレベルにまで精製した。これらの精製標品を、亜硫酸存在下でトレハロースホスホリラーゼを作用させ分解し、その分解物をGC分析したところ、いずれのクロマトグラムにおいても、グルクロン酸若しくはグルコース6位糖質誘導体とD-グルコースに相当するピークが、モル比に換算してほぼ1:1に相当する面積比で確認された。

また、これら精製標品の還元力をソモギー・ネルソン法で測定したところ、いずれも非還元性であることが判明した。これらの結果は、ここで得た精製標品が、いずれも、グルクロン酸若しくはグルコース6位糖質誘導体とグルコシル基が1:1のモル比で結合し、グルクロン酸の場合はその1位がグルコシル基と結合し、イソマルトース、ゲンチビオース、メリビオース、イソマルトトリオース及びイソパノースの場合はそれらの還元末端グルコースの1位がグルコシル基と結合したグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体であることを意味している。

【実施例2】

【0032】

<グルコシル転移ミオイノシトール含有シラップの製造>

β -D-グルコース-1リン酸を2% (w/v)、ミオイノシトールを10% (w/v)、及び、実施例1-1の方法で得たトレハロースホスホリラーゼを1単位/m1含み、pHを6.0に調整した水溶液を、60℃で72時間保持してミオイノシトールへのグルコシル基の転移反応を行った。その後、反応液を常法により脱色・脱塩し、イオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより分画した。各画分の一部を常法により分析し、上記の反応で生成したいずれかのグルコシル転移ミオイノシトールの固形分当たりの含量が、反応液における場合と比較して相対的に高まった画分を合一した。合一した画分を濃縮して、固形分濃度約72%のグルコシル転移ミオイノシトール含有シラップを得た。本シラップの一部を実施例1-2に記載のGCで分析し、その結果得られたクロマトグラムにおけるピーク面積に基づいて計算したところ、本シラップにおける固形物質量当たりの全グルコシル転移ミオイノシトールの含量は約60%と見積もられた。

【0033】

本品は、甘味料、難消化性甘味料、低う食性甘味料、保湿剤、澱粉老化防止剤、整腸剤などとして、健康食品・飲料を含む飲食品分野、飼料・餌料分野、化粧品分野、医薬品分野などの諸種の分野で有利に利用できる。

【実施例3】

【0034】

<グルコシル転移グルクロン酸含有シラップの製造>

トレハロースを20% (w/v)、リン酸二カリウム-クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を10mM、グルクロン酸ナトリウム塩を2% (w/v)、及び、実施例1-1の方法で得たトレハロースホスホリラーゼを20単位/m1含む水溶液を調製し、これを55℃で96時間保持してグルクロン酸へのグルコシル基の転移反応を行った。その後、反応液を常法により脱色し、イオン交換樹脂へ吸着させた後、希塩酸にて溶出し、イオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより分画した。各画分の一部を常法により分析し、グルコシル転移グルクロン酸含有画分を合一した。合一した画分を中和した後濃縮して、固形分濃度約60%のグルコシル転移グルクロン酸含有シラップを得た。本シラップの一部を実施例1-2に記載のGCで分析し、その結果得られたクロマトグラムにおけるピーク面積に基づいて計算したところ、本シラップにおける固形物質量当たりのグルコシル転移グルクロン酸の含量は約70%と見積もられた。

【0035】

本品は、酸味料、甘味料、保湿剤、ミネラル安定化剤などとして、健康食品・飲料を含む飲食品分野、飼料・餌料分野、化粧品分野、医薬品分野などの諸種の分野で有利に利用できる。

【実施例4】

【0036】

<グルコシル転移イソマルトース含有シラップの製造>

トレハロースを20% (w/v)、リン酸二カリウム-クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を5mM、イソマルトースを20% (w/v)、及び、実施例1-1の方法で得たトレハロースホスホリラーゼを10単位/m1含む水溶液を調製し、これを60℃で72時間保持してイソマルトースへのグルコシル基の転移反応を行った。その後、反応液を常法によ

り脱色・脱塩し、イオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより分画した。各画分の一部を常法により分析し、上記の反応で生成したグルコシル転移イソマルトースの固体分当たりの含量が、反応液における場合と比較して相対的に高まった画分を合一した。合一した画分を濃縮して、固体分濃度約72%のグルコシル転移イソマルトース含有シリップを得た。本シリップの一部を実施例1-2に記載のGCで分析し、その結果得られたクロマトグラムにおけるピーク面積に基づいて計算したところ、本シリップにおける固体物質量当たりのグルコシル転移イソマルトースの含量は約50%と見積もられた。

【0037】

本品は、甘味料、難消化性甘味料、抗う食性甘味料、保湿剤、澱粉老化防止剤、整腸剤などとして、健康食品・飲料を含む飲食品分野、化粧品分野、医薬品分野、飼料分野などの諸種の分野で有利に利用できる。

【産業上の利用可能性】

【0038】

以上説明したとおり、本発明は、トレハロースホスホリラーゼがイノシトール、リビトール、エリスリトール、グリセロール、グルクロン酸、イソマルトース、ゲンチビオース、メリビオース、イソマルトトリオース及びイソパノースに極めて効率的にグルコシル基を転移する作用を有するという、本発明者等による全く独自の発見に基づくものである。本発明の転移方法によれば、従来知られていなかった、又は従来稀少とされてきたグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、及びグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体を工業的規模で製造することが可能である。本発明の転移方法を利用して製造されるグルコシル転移ポリアルコール含有物、グルコシル転移グルクロン酸含有物、及びグルコシル転移グルコース6位糖質誘導体含有物は、健康食品・飲料を含む飲食品分野、飼料・餌料分野、化粧品分野、医薬品分野、研究用試薬分野などの諸種の分野で有利に利用できる。本発明は、斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 酵素反応を利用してグルコシル転移ポリアルコール、グルコシル転移グルクロン酸、及びグルコシル転移グルコース 6 位糖質誘導体を生成する新規な方法を提供する。

【解決手段】 構成糖としてグルコースを含む糖化合物と、イノシトール、リビトール、エリスリトール及びグリセロールから選ばれる 1 種又は 2 種以上のポリアルコール、グルクロン酸及び／又はその塩、及び／又は、イソマルトース、ゲンチビオース、メリビオース、イソマルトオリオース及びイソパノースから選ばれる 1 種又は 2 種以上のグルコース 6 位糖質誘導体とにトレハロースホスホリラーゼを作用させることを特徴とするポリアルコール、グルクロン酸、及びグルコース 6 位糖質誘導体へのグルコシル基の転移方法を提供することにより解決する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-019118
受付番号	50400135077
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 1月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 1月28日
-------	-------------

特願 2004-019118

出願人履歴情報

識別番号 [000155908]

1. 変更年月日 1998年10月21日

[変更理由] 住所変更

住 所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
氏 名 株式会社林原生物化学研究所